

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号  
特開2003-235400  
(P2003-235400A)

(43)公開日 平成15年8月26日(2003.8.26)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード(参考)
A 0 1 K 67/027	Z N A	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 6
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 P 13/12		A 6 1 P 13/12	4 C 0 8 4
43/00	1 0 7	43/00	1 0 7
C 1 2 N 15/09		G 0 1 N 33/15	Z
審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 20 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2002-33148(P2002-33148)

(22)出願日 平成14年2月8日(2002.2.8)

(71)出願人 597142376

宮田 敏男

神奈川県伊勢原市桜台2丁目16-25 エクセル伊勢原102号

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72)発明者 宮田 敏男

神奈川県伊勢原市桜台2丁目16-25 エクセル伊勢原102号

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 腎機能障害モデル動物

(57)【要約】

【課題】 糸球体における障害の修復機能に障害を有する腎機能障害モデル動物の提供。

【解決手段】 糸球体におけるメグシン遺伝子の発現を増強した動物の糸球体を障害する工程を含む、糸球体における損傷の修復機能が阻害された腎機能障害モデル動物の製造方法が提供された。障害の修復機能に障害を有するモデル動物は新規である。このモデル動物は、糸球体の修復機構の研究や、ヒトの腎機能障害の治療薬のスクリーニングに有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】糸球体におけるメグシン遺伝子の発現を増強した動物の糸球体を障害する工程を含む、糸球体における損傷の修復機能が阻害された腎機能障害モデル動物の製造方法。

【請求項2】糸球体を糸球体組織に対する抗体によって障害する請求項1に記載の方法。

【請求項3】抗体が、糸球体毛細血管基底膜に結合する抗体である請求項2に記載の方法。

【請求項4】抗体が、前記動物に投与された抗体、または糸球体毛細血管基底膜抗原の免疫によって前記動物において誘導された自己抗体である請求項3に記載の方法。

【請求項5】次の特徴(a)および(b)を有する、糸球体における損傷の修復機能が阻害された腎機能障害モデル動物。

(a)糸球体におけるメグシン遺伝子の発現が増強している

(b)糸球体の血液透析機能と形態的特徴は実質的に正常である

【請求項6】次の工程を含む、被験化合物の糸球体における障害の修復機能を増強する活性を測定する方法。

(1) 次の特徴(a)および(b)を有する、糸球体における損傷の修復機能が阻害された腎機能障害モデル動物を調製する工程、

(a)糸球体におけるメグシン遺伝子の発現が増強している

(b)糸球体の血液透析機能と形態的特徴は実質的に正常である

(2)前記動物の糸球体に損傷を与える工程、

(3)工程(2)の前および／または後に前記動物に被験化合物を投与する工程、および

(4)糸球体における損傷の回復の程度を評価する工程

【請求項7】請求項6に記載の方法によって被験化合物の糸球体における障害の修復機能を増強する活性を測定し、被験化合物を投与しない対照と比較して、前記活性が大きい化合物を選択する工程を含む、糸球体における損傷の修復機能を増強する活性を有する化合物のスクリーニング方法。

【請求項8】請求項7に記載の方法によって選択された化合物を有効成分として含む、糸球体の損傷を修復するための薬剤。

【請求項9】腎組織においてメグシン、またはメグシンと機能的に同等な遺伝子の発現を増強する工程を含む、非ヒト脊椎動物の糸球体における損傷を修復する機能を障害する方法。

【請求項10】腎組織においてメグシン、またはメグシンと機能的に同等な遺伝子の発現を増強した動物からなる、糸球体における損傷を修復する機能が障害された非ヒト脊椎動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は腎機能障害モデル動物に関する。

【0002】

【従来の技術】腎機能障害のモデル動物は、腎機能の障害機構の解明や、腎機能障害の治療薬の開発において有用である。数多くの腎機能障害モデル動物が公知である。公知の腎炎モデル動物は、腎臓機能を人為的に障害することによって得られていた。腎機能障害モデルとして、たとえば以下のようなモデル動物が公知である。

【0003】抗GBM腎炎：動物に糸球体毛細血管基底膜(GBM)抗原を認識する抗体を投与すると、糸球体への免疫複合体の蓄積などの病態を伴った、腎機能障害モデルを確立できることが公知である。GBM腎炎モデル動物においては、抗GBM抗体の投与によって一過性に腎機能が障害される。しかし修復機構には問題が無いので、やがて腎機能障害は回復する。

【0004】メグシントランスジェニック動物：本発明者らは、メサングウム細胞に特異的に発現する遺伝子としてメグシンを単離した。そして、メグシンを導入したトランスジェニック動物が、メサングウム増殖性腎炎のモデル動物として有用であることを明らかにした。約35-40週齢を迎えたメグシントランスジェニックマウスの腎糸球体組織では、メサングウム細胞を主体とする著明な細胞増殖、メサングウム基質の増生、並びに補体、免疫グロブリンから成る免疫複合体の沈着が認められ、分節性の硬化(segmental sclerosis)に陥っていることが観察される。しかしこのモデル動物において、障害された腎機能の修復機構に異常が見られることは知られていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、糸球体における損傷の修復機構に障害を有するモデル動物の提供である。また本発明は、糸球体における損傷の修復機構の障害に起因する疾患の治療に有用な化合物のスクリーニング方法の提供を課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】糸球体におけるメグシンの強制発現が、メサングウム増殖性腎炎の原因となることが本発明者によって既に明らかにされている。本発明者は、メグシンによる腎機能障害の原因について更に研究を進め、メグシンによって糸球体における損傷の修復が遅れることを見出した。そして、糸球体におけるメグシンの発現を増強した動物が、糸球体における損傷の修復に障害を有するモデル動物として有用であることを明らかにして、本発明を完成した。

【0007】すなわち本発明は、以下の腎機能障害モデル動物、その製造方法、並びにこのモデル動物を用いたスクリーニング方法に関する。

〔１〕糸球体におけるメグシン遺伝子の発現を増強した動物の糸球体を障害する工程を含む、糸球体における損傷の修復機能が阻害された腎機能障害モデル動物の製造方法。

〔２〕糸球体を糸球体組織に対する抗体によって障害する〔１〕に記載の方法。

〔３〕抗体が、糸球体毛細血管基底膜に結合する抗体である〔２〕に記載の方法。

〔４〕抗体が、前記動物に投与された抗体、または糸球体毛細血管基底膜抗原の免疫によって前記動物において誘導された自己抗体である〔３〕に記載の方法。

〔５〕次の特徴(a)および(b)を有する、糸球体における損傷の修復機能が阻害された腎機能障害モデル動物。

(a)糸球体におけるメグシン遺伝子の発現が増強している

(b)糸球体の血液透析機能と形態的特徴は実質的に正常である

〔６〕次の工程を含む、被験化合物の糸球体における障害の修復機能を増強する活性を測定する方法。

(1) 次の特徴(a)および(b)を有する、糸球体における損傷の修復機能が阻害された腎機能障害モデル動物を調製する工程、

(a)糸球体におけるメグシン遺伝子の発現が増強している

(b)糸球体の血液透析機能と形態的特徴は実質的に正常である

(2)前記動物の糸球体に損傷を与える工程、

(3)工程(2)の前および／または後に前記動物に被験化合物を投与する工程、および

(4)糸球体における損傷の回復の程度を評価する工程

〔７〕〔６〕に記載の方法によって被験化合物の糸球体における障害の修復機能を増強する活性を測定し、被験化合物を投与しない対照と比較して、前記活性が大きい化合物を選択する工程を含む、糸球体における損傷の修復機能を増強する活性を有する化合物のスクリーニング方法。

〔８〕〔７〕に記載の方法によって選択された化合物を有効成分として含む、糸球体の損傷を修復するための薬剤。

〔９〕腎組織においてメグシン、またはメグシンと機能的に同等な遺伝子の発現を増強する工程を含む、非ヒト脊椎動物の糸球体における損傷を修復する機能を障害する方法。

〔１０〕腎組織においてメグシン、またはメグシンと機能的に同等な遺伝子の発現を増強した動物からなる、糸球体における損傷を修復する機能が障害された非ヒト脊椎動物。

【０００８】

【発明の実施の形態】本発明において、糸球体における損傷の修復機構の障害とは、損傷の原因を取り除いた後

の障害を修復する機能が低下することを言う。たとえば正常なマウスに抗GMB抗体を投与して抗GBM腎炎を起こした場合には、腎機能障害は一過性で、やがて腎機能は回復する。一方メグシンを腎組織において強制発現したトランスジェニック動物においては、糸球体機能の修復が遅れるため、抗体投与後の腎機能障害の修復は著しく遅れる。本発明において、障害が修復できないとは、回復が見られない場合のみならず、野生型に比べて回復が遅れる場合を含む。

【０００９】また本発明においては、修復機構の障害は、損傷を与えない状態にある場合を含む。つまり、損傷を与えた場合にその修復機構が不完全であれば、損傷の有無には関わらず、修復機構が障害された状態にあると言う。したがって本発明の腎機能障害モデル動物は、損傷を与えられていない状態にある動物を含む。また腎機能障害とは、糸球体による血液透析機能が低下した状態をいう。本発明における糸球体の損傷とは、糸球体の機能を妨げる任意の損傷を言う。たとえば、糸球体を構成する組織を認識する抗体による免疫学的な損傷が挙げられる。

【００１０】本発明は、糸球体におけるメグシン遺伝子の発現を増強した動物の糸球体を障害する工程を含む、糸球体における損傷の修復機能が阻害された腎機能障害モデル動物の製造方法に関する。本発明に用いる糸球体におけるメグシン遺伝子の発現を増強した動物は、たとえばメサングウム細胞においてメグシン遺伝子を導入し強制発現することによって得ることができる。あるいは、メグシン遺伝子のプロモーターに作用して、メグシン遺伝子の発現を促進する化合物の投与によって、メグシン遺伝子の発現を増強することもできる。メグシン遺伝子のプロモーターや、このプロモーターに作用する薬剤の取得方法は公知である(WO 00/43528)。

【００１１】本発明に用いるメサングウム細胞においてメグシンの発現を増強した動物は、公知のトランスジェニック動物の作製方法によって得ることができる。トランスジェニック動物は、たとえば「発生工学実験マニュアル」(野村達次監修、勝木元也編、講談社、1989年)や、「新生化学実験講座・動物実験法」(日本生化学会編、東京化学同人、1991年)などに従って作製される。以下に、一般的なトランスジェニック動物の作製プロトコルに従って述べる。なおメグシン遺伝子、並びにこの遺伝子によってコードされる蛋白質は公知である(WO 99/15652)。更に本発明者は、このDNAをメサングウム細胞において強制発現させたトランスジェニック動物が、メサングウム細胞増殖性腎炎のモデル動物として有用であることを明らかにした(WO 01/24628)。しかしこのトランスジェニック動物が、糸球体の損傷の修復機構に障害を有する腎機能障害モデル動物として利用できることは知られていない。

【００１２】ヒト・メグシンは、配列番号：１に示す塩

基配列を持つDNAによってコードされるタンパク質である。その推定アミノ酸配列を、配列番号：2に示す。本発明においては、トランスジェニック動物として、ヒト・メグシンのみならず、ヒト・メグシンと機能的に同等な機能を有するタンパク質をコードするDNAを導入した動物を用いることもができる。このようなタンパク質としては、たとえば他の種におけるメグシンのホモログを示すことができる。メグシンのホモログには、たとえばラット・メグシン、そしてマウス・メグシンの構造が本発明者によって明らかにされている(WO 99/15652)。ラットメグシンの塩基配列、並びにアミノ酸配列を配列番号：3、および配列番号：4に、そしてマウス・メグシンの塩基配列、並びにアミノ酸配列を配列番号：5、および配列番号：6に示す。

【0013】また、一般に、真核生物の遺伝子はヒトインターフェロン遺伝子で知られているように多形現象を示すことが多い。この多形現象によって、アミノ酸配列に1個あるいはそれ以上のアミノ酸の置換を生じて、通常タンパク質の活性は維持される。また一般に、1個または数個のアミノ酸の改変では、タンパク質の活性は維持される場合が多いことが知られている。従って、配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6のいずれかに示されるアミノ酸配列を人工的に改変したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質が糸球体の損傷の修復機構に障害をもたらす限り、すべて本発明に利用することができる。

【0014】以下、ヒト、ラット、あるいはマウスに由来するメグシンと、その機能的に同等な機能を有するタンパク質を総称してメグシン類と記載する。なおメグシン類としてマウスに由来するメグシンをコードするDNAをマウスに導入する場合であっても、人為的に導入したマウスに由来するDNAは外来性のDNAである。しかしながら、このトランスジェニック動物を糸球体の損傷の修復機構に障害を有する腎機能障害モデル動物として、ヒトにおける治療剤に有用な化合物のスクリーニングを行うには、ヒト・メグシンのDNAを用いるのが有利である。トランスジェニック動物の体内でヒト・メグシンに対する影響を、より忠実に反映できる可能性が期待できるためである。

【0015】また、アミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる

[Grantham, R. et al. Nucleic Acids Res. 9, r43 (1981)]。従って、コドンの縮重を考慮して、DNAを適宜改変したものもまた本発明のDNAに含まれる。さらに、これら核酸配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的変位導入法 (sitespecific mutagenesis) [Mark, D.F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 5662 (1984)] 等に従うことがで

きる。

【0016】更に、配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5のいずれかに記載の塩基配列を含むDNAとハイブリダイズすることができ、かつそのDNAによってコードされるタンパク質が糸球体における損傷の修復機能の障害をもたらす限り、そのDNAは本発明によるDNAに含まれる。ストリンジェントな条件下で特定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配列がコードするタンパク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。ストリンジェントな条件とは、洗浄のための条件として通常「1xSSC、0.1% SDS、37℃」程度、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42℃」程度、さらに厳しい条件として「0.1xSSC、0.1% SDS、55℃」程度を示すことができる。加えて、本発明におけるメグシン類をコードするDNAは、トランスジェニック動物に糸球体における損傷の修復機能の障害をもたらす限り、その断片を利用することもできる。

【0017】本発明においてトランスジェニック動物の作製に用いられるメグシン類をコードするDNAは、本明細書に開示した塩基配列に基づいて公知の方法により得ることができる。たとえば、メサングウム細胞のcDNAライブラリーを配列番号：1、配列番号：3、あるいは配列番号：5に示した塩基配列からなるDNAをプローブとしてスクリーニングすることにより、メグシン類をコードするcDNAの単離が可能である。またこのcDNAライブラリーを鋳型として、配列番号：1、配列番号：3、あるいは配列番号：5に示した塩基配列に基づいて設定したプライマーを用いてPCRを行うことによって、メグシン類をコードするDNAを増幅することができる。増幅生成物は、公知の方法に基づいてクローニングする。

【0018】メグシン類をコードするDNAは、この遺伝子を導入すべき動物の細胞において発現可能なプロモーターに連結した組み換え遺伝子コンストラクトとするのが有利である。本発明の組み換え遺伝子コンストラクトは、適当な宿主を利用してクローニング可能なベクターに、前記メグシン類をコードするDNAと、その上流にプロモーターとを挿入し、クローニングすることによって構築することができる。本発明に利用することができるプロモーターとしては、マウスやラットなど、幅広い脊椎動物で外来遺伝子の発現を誘導できるニワトリβアクチン・プロモーターを示すことができる。

【0019】また、外来遺伝子の発現を増強するために、エンハンサーを組み合わせることができる。たとえば、CMVに由来するエンハンサーは、哺乳動物における外来遺伝子の発現を増強することが知られている。これらの遺伝子から構成される組み換え遺伝子コンストラクトの構築にあたり、エンハンサーとプロモーターを備え、更にその下流に外来遺伝子挿入用のマルチクローニングサイトを配置したベクターを用いることができる。このような構造を持つベクターは、たとえばpCAGGS(Niwa

a H, Yamamura K and Miyazaki J (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108,193-200.)等をもとに実施例に示すような方法によって構築することができる。このベクターは、マルチクローニングサイトの下流にウサギβグロビン・ターミネーターが配置されており、挿入された外来遺伝子の発現効率の向上に貢献する。

【0020】適当な制限酵素によって前記ベクターから切り出した組み換え遺伝子コンストラクトは、十分に精製されトランスジェニック動物の作製に用いられる。トランスジェニック動物は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに、前記コンストラクトを導入することによって作製される。コンストラクトを導入する細胞としては、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階、より具体的には単細胞あるいは受精卵細胞の段階で、通常8細胞期以前のものが利用される。コンストラクトの導入方法としては、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法等が公知である。さらに、こうして得られた形質転換細胞を上述の胚芽細胞と融合させることによりトランスジェニック動物を作製することもできる。

【0021】コンストラクトを導入する細胞は、トランスジェニック動物の作製が可能なあらゆる非ヒト脊椎動物に由来する細胞であることができる。具体的には、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、イヌ、あるいはネコ等の細胞を利用することができる。たとえばマウスにおいては、排卵誘発剤を投与したメスのマウスに正常なオスのマウスを交配させることにより、コンストラクトの導入が可能な受精卵を回収することができる。マウス受精卵では、一般に雄性前核へのマイクロインジェクションによりコンストラクトが導入される。コンストラクトを導入した細胞は、体外で一晩程度の培養の後、導入に成功したと思われるものが代理母の卵管に移植され、トランスジェニックキメラ動物が誕生する。代理母には、精管を切断したオスと交配させて偽妊娠状態としたメスが利用される。

【0022】生まれたトランスジェニックキメラ動物は、その体細胞の遺伝子を解析することによって、ゲノムに外来遺伝子（メグシン類をコードするDNA）が組み込まれていることを確認した上で、F1動物の誕生のために正常な動物と交配させる。このとき、望ましくは、より多くのコピー数を持つ個体を選択するようにする。一般にコンストラクトとして導入した外来性のDNAは、ゲノムの同一の部分に複数コピーが直列に組み込まれる。通常はこの組み込みコピー数が多いほど、多量の遺伝子発現につながり、より明瞭な発現型が期待できるた

めである。体細胞ゲノムにおいて、外来遺伝子（メグシン類をコードするDNA）が正しい方向で組み込まれていることは、コンストラクトに特異的なプライマーを用いたPCRによって確認することができる。また、ドットブロット法によって、コピー数の相対的な比較が可能である。

【0023】この交配の結果誕生するF1動物の中で、体細胞に外来遺伝子（メグシン類をコードするDNA）を備えるものは、ヘテロサイゴート(heterozygote)ながら生殖細胞に外来遺伝子（メグシン類をコードするDNA）を伝えることができるトランスジェニック動物である。したがって、F1動物の中から体細胞に外来遺伝子（メグシン類をコードするDNA）を保持するものを選び、これらを両親とするF2動物を誕生させることができれば、外来遺伝子（メグシン類をコードするDNA）をホモで保持するホモサイゴート動物(homozygote animal)がF2動物として得られる。

【0024】本発明の糸球体の損傷の修復機構に障害を有する腎機能障害モデル動物には、メサングウム細胞で外来性のメグシン類のDNAを発現するものである限り、これらトランスジェニック動物のいずれの世代であっても、利用することができる。たとえば、メグシン類のDNAをヘテロで保持するトランスジェニック動物であっても、この外来性のメグシン類がメサングウム細胞で発現すれば、糸球体の損傷の修復機構に障害を有する腎機能障害モデル動物として有用である。

【0025】なお本発明においては、外来性のメグシン類のDNAを、少なくともメサングウム細胞で発現させることができれば、本発明の腎機能障害モデル動物とすることができる。したがって、外来性のメグシン類のDNAを、必ずしもメサングウム細胞や腎特異的に発現させなくてもよい。たとえば実施例に示すように、ヒトメグシンを全身性に発現するトランスジェニックマウスであっても、糸球体の損傷の修復機構に障害を有する腎機能障害モデル動物とすることができる。

【0026】トランスジェニック動物が糸球体の損傷の修復機構に障害を有することは、糸球体に異常を有しない状態にある動物に、糸球体の損傷を与え、対照と比較することによって確認することができる。対照には、損傷の修復機構に障害を持たないことが明らかな動物を用いる。たとえば、野生型のマウスは、対照として好ましい。糸球体の損傷は、腎機能のマーカーを測定することにより知ることができる。たとえば、血清クレアチニン値、あるいは尿中のアルブミン等の一般的な腎機能マーカーが利用できる。これらの腎機能マーカーの測定方法は公知である。この他、糸球体組織の形態学的な変化を、損傷の指標とすることもできる。たとえば、腎臓組織のPAS染色により、メサングウム細胞数やメサングウム基質の面積を観察し、増殖性糸球体腎炎の程度をスコア化することができる。

【0027】糸球体においてメグシンの発現を増強した動物は、糸球体における損傷の修復機構に障害を有するモデル動物として用いることができる。本発明において、メサングウム細胞においてメグシンの発現を増強した動物は、糸球体に対する損傷を与えない状態では、糸球体における異常が認められないことが望ましい。すなわち、糸球体の本来の機能は維持されており、損傷の修復機能が特異的に妨げられている動物が好ましい。このような条件を満たすことにより、損傷の修復の状態を特異的に観察することができる。たとえば修復機構に作用する治療薬のスクリーニングにおいては、損傷の修復機能に対する障害の特異性は、そのスクリーニングの特異性を左右する。したがって障害が修復機構以外に及ぶモデル動物を用いたスクリーニング方法では、修復機構以外に作用する活性を有する化合物を選択してしまう可能性がある。本発明の腎機能障害モデル動物は、修復機構が特異的に障害されていることから、修復機構に対する活性を特異的に評価することができる。

【0028】本発明の腎機能障害モデル動物は、次の特徴によって定義することもできる。

(a)糸球体におけるメグシン遺伝子の発現が増強している

(b)糸球体の血液透析機能と形態的特徴は実質的に正常である

このような特徴を有する本発明の腎機能障害モデル動物は、糸球体に損傷を与えることによって、容易に損傷の修復が障害された状態とすることができる。

【0029】本発明において、糸球体の血液透析機能と形態的特徴が実質的に正常とは、これらの特徴が正常な動物と同様の状態を維持していることを言う。血液透析機能が正常であることは、腎機能マーカーが正常な値であることによって知ることができる。腎機能マーカーとしては、たとえば血清クレアチニンを指標とすることができる。また糸球体の形態的な特徴が正常であることは、糸球体の肥大、基質増生、あるいはメサングウム細胞の増殖等の異常所見が見られないことによって確認することができる。

【0030】また本発明において、糸球体の損傷を与える方法は任意である。公知の腎機能障害を与える方法は、いずれも本発明に利用することができる。糸球体を損傷する方法として、たとえば次のような方法を示すことができる。

糸球体毛細血管基底膜(GBM)抗原を認識する抗体の投与  
糸球体毛細血管基底膜(GBM)抗原を認識する抗体を誘導する抗原の投与

糸球体に損傷を与える薬剤の投与

【0031】これらの方法の中で、特に抗GBM抗体を投与する方法は、次のような理由により、望ましい方法とすることができる。迅速に糸球体を損傷できること、糸球体に与える影響が一過性であること、糸球体の損傷に

個体差が現れにくいこと、

【0032】抗GBM抗体は、モデル動物とは異なる動物を、モデル動物のGBM抗原で免疫することによって得ることができる。抗GBM抗体を得る方法は公知である(Hisada et al., Angiotensin II plays a pathogenic role in immune-mediated renal injury in mice. J. Clin. Invest. 103:627-635, 1999)。抗GBM抗体を得るための免疫動物は、限定されない。更に、抗GBM抗体は、抗血清であっても良いし、精製抗体としてから投与することもできる。あるいは、抗GBM抗体としてモノクローナル抗体を用いることもできる。

【0033】抗GBM抗体に代えて、GBM抗原の投与によってモデル動物に抗GBM抗体を誘導するためには、GBM抗原を適当なアジュバントとともにモデル動物に投与する。あるいは、腎機能に障害を与える化合物の投与によって、糸球体に損傷を与えることもできる。糸球体に損傷を与える化合物としては、ストレプトゾドシンやハブ毒等を示すことができる。

【0034】本発明において、メサングウム細胞においてメグシンの発現を増強した動物にメグシントランスジェニック動物を用いる場合には、メサングウム細胞における異常所見が見出される前の、週齢の若い個体を利用するのが望ましい。具体的には、週齢5〜20、たとえば10〜15、より具体的には11〜13週のメグシントランスジェニック動物は、本発明のメサングウム細胞においてメグシンの発現を増強した動物として好ましい。この時期のメグシントランスジェニック動物は、メサングウム細胞には形態学的にも機能的にも、異常は見られない。しかし、糸球体における損傷の修復機能は著しく低下している。そのため、糸球体に何らかの損傷を与えられると、その損傷の修復は野生型と比較して著しく遅れる。

【0035】たとえば抗GBM抗体の投与によって糸球体に損傷を与えられた本発明の腎機能障害モデルマウスは、実施例において示したように、抗体投与後28日目にも糸球体の機能や形態の損傷が修復されない。この時期の糸球体の異常は、抗体投与後7日目の結果に比べて、更に増悪していた。一方、修復機能に障害の無い野生型マウスでは、28日目の糸球体に異常は認められない。7日目の糸球体の損傷程度が両者の間で違いが見られないことから、野生型では7日目〜28日目の間に、糸球体の損傷がほぼ完全に修復されていることがわかる。

【0036】メグシントランスジェニックマウスが、メグシンの強制発現によって糸球体に異常を呈するのは、35〜40週である。これに対して実施例に示した糸球体の異常の継続は、15〜19週にかけて観察された現象である。これらの知見により、メグシントランスジェニック動物は、糸球体の異常が見られない状態であっても、糸球体における損傷の修復機構に障害を有している



ことが裏付けられる。

【0037】メグシンは、SERPIN スーパーファミリーに属するプロテアーゼインヒビターの構造的な特徴を持っている。糸球体における損傷の修復に必要なプロテアーゼに対して、メグシンが阻害的に働くことが、修復の障害の原因であると予測される。メグシントランスジェニック動物におけるメサングウム細胞の障害が、週齢が若い時期には見られないことも、この予測を裏付けている。つまり、メグシンによって、長期にわたって修復機構が障害される結果、損傷が蓄積して腎機能障害に至るのである。

【0038】本発明によって得られる腎機能障害モデル動物は、糸球体の損傷を修復する機能に障害を有する。このようなモデル動物はこれまでに知られていない。マウス等の実験動物では、様々な腎機能障害モデルが報告されている。しかし公知のモデルにおいては、糸球体に対する損傷を与えることしか考慮されていなかった。このようなモデルでは、損傷の原因やそれを防ぐための研究することはできても、修復機構の研究は行い得ない。

【0039】糸球体における損傷の修復機構は、ヒトの腎機能障害を理解するための大切な仕組みである。現在のところ、慢性化した腎炎に対する有効な治療方法は知られていない。ヒトにおいては、糸球体の損傷を修復する機能を改善することは、重要な研究課題である。ところが、マウスなどの実験動物では、糸球体の損傷が修復されてしまうことが多い。そのため、慢性化した腎機能障害を実験動物で再現するには、糸球体に対する損傷を継続的に与える必要があった。このことは、実験動物によって得られる公知の腎機能障害モデルでは、ヒトの、特に慢性化した腎機能障害を再現できないことを意味している。慢性化した腎機能障害の治療方法が開発されない原因の一つは、修復機構が障害された病態を人為的に再現できないことにある。

【0040】本発明のモデル動物は、修復機構が障害された状態を再現できることから、糸球体の損傷の修復についての研究に貢献する。具体的には、本発明のモデル動物によって、糸球体における損傷の修復機構の解明や、損傷の修復を促進する治療薬開発のための大規模な薬剤スクリーニングを実現することができる。

【0041】本発明の糸球体における損傷の修復機構に障害を有するモデル動物を利用して、糸球体における損傷の修復機構の障害に対する被験化合物の治療効果を評価することができる。本発明による評価方法は、以下の工程によって実施される。

(1) 次の特徴(a)および(b)を有する、糸球体における損傷の修復機能が阻害された腎機能障害モデル動物を調製する工程、(a)糸球体におけるメグシン遺伝子の発現が增強している(b)糸球体の血液透析機能と形態的特徴は実質的に正常である

(2)前記動物の糸球体に損傷を与える工程、

(3)工程(2)の前および／または後に前記動物に被験化合物を投与する工程、および

(4)糸球体における損傷の回復の程度を評価する工程  
また本発明の糸球体における損傷の修復機構に障害を有するモデル動物を利用して、糸球体における損傷の修復機構の障害のための治療用化合物のスクリーニングを実施することができる。本発明のスクリーニング方法は、前期評価方法によって被験化合物の糸球体における障害の修復機能を增強する活性を測定し、被験化合物を投与しない対照と比較して、前記活性が大きい化合物を選択することによって実施することができる。

【0042】本発明の評価方法、あるいはスクリーニング方法において、糸球体の損傷の回復の程度は、腎機能マーカーを指標として評価することができる。たとえば次のような腎機能マーカーが知られている。これらの腎機能マーカーを測定するための方法も公知である。

血中のクレアチニン値

血中の尿素窒素

尿中ヘモグロビン

尿中アルブミン

尿中 $\beta$ 2-ミクログロブリン

尿中 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白

したがって、被験化合物を投与する前後で、これらの指標の観察結果を比較することにより、被験化合物の治療薬としての有効性を評価することができる。あるいは、同系のトランスジェニック動物を用いれば、動物の間でこれらの指標の観察結果を比較することによって、被験化合物間の有効性を比較することもできる。

【0043】本発明のスクリーニングに用いる被験化合物としては、例えば、天然または合成化合物、各種有機化合物、天然または合成された糖類、タンパク質、ペプチド、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞抽出物、あるいは菌体成分などを挙げることができる。この他、メグシン類の発現を制御するアンチセンス核酸や、メグシン類の活性抑制が期待される抗メグシン類抗体を被験化合物とすることもできる。これらの被験化合物は、本発明の腎機能障害モデル動物に、経口的に、あるいは非経口的に投与される。

【0044】被験化合物は、前記糸球体に損傷を与える前および／または後に腎機能障害モデル動物に投与することができる。しかし損傷の修復過程に対してより特異的に作用する化合物を見出すためには、損傷を与えた後に被験化合物を投与するのが好ましい。被験化合物の投与のタイミングを変えて、修復機能に対する作用を比較することにより、より効果的な投与時期を明らかにすることもできる。

【0045】本発明のスクリーニング方法によって選択された被験化合物は、更に安全性や安定性などを試験したうえで、糸球体における損傷の修復のための治療用医薬組成物の有効成分とすることができる。本発明の医薬

組成物は、公知の製剤学的製造法により製剤化して投与することができる。また有効成分である化合物自体を直接投与することもできる。製剤化する場合、例えば、薬剤として一般的に用いられる媒体または担体と適宜組み合わせ投与することができる。

【0046】また、該化合物がDNAによりコードされるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、鼻腔内投与、気管支内投与、筋肉内投与、皮下投与、経口投与、患部への直接投与などの方法で行うことができる。投与量は、患者の体重、年齢、健康度、あるいは投与方法などの条件によって変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することができる。

【0047】すなわち、たとえば本発明の腎機能障害モデル動物において、損傷修復機能の増強効果を、様々な投与量の間で比較することにより有効濃度が決定される。そして、上記のような各投与ルートによって、メサンギウム細胞における投与化合物の濃度がその有効濃度に達するような投与量を経験的に決定する。一般的な投与形態においては、有効成分が全身に分布するものとして、体重1kg当たりの投与量を決定する。実験動物における薬物動態の解析結果に基づいて腎移行性が高いと考えられる化合物であれば、投与量をより低く設定することができる。

【0048】本発明の医薬組成物は、決定された投与量と投与形態とを考慮して、媒体や担体と配合される。必要な投与量を達成することができるように有効成分を配合することは、当業者が通常行っている。本発明による医薬組成物の投与量は、体重1kgあたり通常1 $\mu$ g-10mg、より一般的には10 $\mu$ g-1mgとすることができる。また、注射剤の場合は経口投与の100分の1程度を投与量の目安とすることができる。さらに特殊な製剤設計を施すことにより、投与量を調整することができる。例えば、本発明の医薬組成物は、適当な担体に保持することによって徐放化製剤とすることもできるが、このような

CMV-F1:5'-GTC GAC ATT GAT TAT TGA CTA G-3'

CMV-R1:5'-CCA TAA GGT CAT GTA CTG-3'

$\beta$ -g1-3:5'-CTT CTG GCG TGT GAC CGG CG-3'

hM2-2:5'-ATC GAA TTC TGA GAT CAT AAT CCC TGT GGG ATG C-3'

hM8-1:5'-TTA TTC AGT GGC AAA GTT TCT TGC CTT TGA-3'

$\beta$ -グロビンR:5'-TCG AGG GAT CTT CAT AAG AGA AGA G-3'

3対のプライマーによるPCRの全てで増幅産物が得られる個体を選別した。得られたF0世代6個体(雄3個体、雌3個体)を、正常個体(C57BL/6N Jcl)と交配させF1世代を得、さらにヘテロのF1を正常個体と交配させてF2を得た。

【0051】[実施例2] 抗GBM抗体腎炎  
ウサギ抗GBM抗血清は、公知の方法を改変して調製した(Hisada et al., Angiotensin II plays a pathogenic r

製剤においては、高い血中濃度を維持することができるので、配合量を低く設定することができる。

【0049】

【実施例1】[実施例1]: メグシントランスジェニックマウス

ヒトメグシン遺伝子導入用コンストラクトを作成するために、メグシンcDNAのコード配列をセンス方向にpBscAG-2(Kawarabashi T. et al., Accumulation of beta-amyloid fibrils in pancreas of transgenic mice. Neurobiol. Aging 17:215-222, 1996)にサブクローニングした。コンストラクトの構造を図1に示した。完全長ヒトメグシンcDNAを、第二イントロンの一部、第三エクソン、および3'-UTRを含むウサギ $\beta$ グロブリン遺伝子の中にサブクローニングした。PCR分析用のプライマーの位置を上記のコンストラクト中に示した。メグシンDNAを含むpBscAG-2を切断して単離されたメグシン組換え遺伝子を、受精したB6C3F1 X C57BL/6Nハイブリッド卵の前核に微量注入し、別に記載(Hogan B. et al., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986)にしたがって偽妊娠したマウスの輸卵管に移入した。

【0050】尾の組織から抽出したマウスゲノムDNAを、メグシン組換え遺伝子のプローブを使ったサザンブロット分析による組換え遺伝子の検出に用いた。またトランスジェニックマウスは、メグシンまたはpBscAG-2ベクターに特異的なプライマーを用いたPCRによって同定した。サイトメガロウィルスエンハンサーPr1のためのプライマー、CMV-F1(配列番号: 7)、およびCMV-R1(配列番号: 8)により、250bpの断片が増幅された。ベクターと挿入されたメグシン遺伝子(Pr2)の間の5'側の連結部分に特異的なプライマー、 $\beta$ -g1-3(配列番号: 9)およびhM2-2(配列番号: 10)により、400bpの断片が増幅された。ベクターと挿入されたメグシン遺伝子(Pr3)の間の3'側の連結部分に特異的なプライマー、hM8-1(配列番号: 11)および $\beta$ -グロビンR(配列番号: 12)により、563bpの断片が増幅された。

ole in immune-mediated renal injury in mice. J. Clin. Invest. 103:627-635, 1999)。8週齢のメグシントランスジェニックマウス(F3またはF4)、および同腹仔の野生型マウスにGBM腎炎を誘導した。フロイントコンプリートアジュバントに懸濁したウサギIgG(Organon, Teknika, West Chester, PA)を、体重1g当たり0.025mg、腹腔に投与することにより、マウスを免疫した。免疫の5日後に100 $\mu$ Lの抗GBM抗血清を尾静脈か



ら静注した。なお予備的な実験によって、100  $\mu$ Lの抗GBM抗血清がメサンギウム領域の拡大を伴った糸球体腎炎を誘導し、その4ヶ月後には完全に回復することが確認されている。メグシントランスジェニックマウス、および野生型マウスに対する抗GBM抗血清処理後、6時間後(N=5)、3日(n=5)、7日(n=5)、および28日(n=10)に、マウスを屠殺した。マウスの腎臓をPAM染色(periodic acid-methenamine-silver stain)、またはPAS染色(periodic acid-Schiff stain)し、メサンギウム基質の拡大を以下のスコア1~4にしたがって評価した。

1: 正常

3: 弱/mild (糸球体係蹄域; glomerular tuft areaの1/3以上)

4: 中/moderate (糸球体係蹄域; glomerular tuft areaの2/3以下)

5: 強/severe (糸球体係蹄域; glomerular tuft areaの2/3以上)

2人の病理学者が20以上の糸球体の断面を独立してブラインドで観察することによって、糸球体をスコア化した。

【0052】糸球体における免疫複合体の沈着は、蛍光抗体法で測定した。すなわち凍結切片を、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識ヤギ抗マウスIgG、IgA、IgM またはC3抗体(Cappel)とインキュベートした。マウスIgGの沈着を比較するために、次のような半定量的なスコアリングシステムを用いた。

1: 正常

2: 0-25%の糸球体領域に沈着

3: 25-50%

4: 50-75%

5: >75%

2人の病理学者が20以上の糸球体の断面を独立してブラインドで観察することによって、糸球体をスコア化した。

【0053】血清クレアチニンレベルは、次の方法によって測定した。まず第1反応として、検体中に存在するクレアチニンが、クレアチニンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、およびカタラーゼの作用で分解される。次に第2反応として、検体中のクレアチニンは、クレアチニンアミドヒドロラーゼの作用でクレアチンとなり、次いでクレアチンアミジノヒドロラーゼによってザルコシンを生じる。生じたザルコシンからザルコシンオキシダーゼによって生成される過酸化水素を、パーオキシダーゼの存在下でN-エチル-N(3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン(TOPS)と4-アミノアンチピリンとを

酸化縮合させ、生成するキノン色素の吸光度を測定することにより、クレアチニン濃度を求めた。

【0054】ストレスを与えたメグシン過剰発現マウスに、糸球体症(glomerulopathy)が見られるかどうかを確認するために、トランスジェニックマウスと野生型マウスに抗GBM腎炎を誘導し、メサンギウム基質の拡大の程度を評価した(図2および図3)。トランスジェニックマウスでは、28日後に、メサンギウム基質の拡大が続いていた。このとき、野生型マウスではメサンギウム基質の拡大は改善されていた。半定量的な解析の結果、28日目の糸球体におけるマウスIgGの蓄積は、両者の間で基本的に同じ程度であった。トランスジェニックマウスと野生型マウスの血清クレアチニンレベルには、経時的な差がなかった。

	トランスジェニック	野生型
7日目	0.11 $\pm$ 0.01mg/dL	0.10 $\pm$ 0.02mg/dL
28日目	0.09 $\pm$ 0.03mg/dL	0.08 $\pm$ 0.04mg/dL

【0055】

【発明の効果】実際の腎機能に異常を有する患者においては、腎機能の障害のみならず、障害された腎組織の修復機構が不十分であることが、疾患の治療を困難にする原因のひとつとなっている。現在までに腎機能障害の原因となる多くの病因が明らかにされ、その病因を取り除くための研究も進んできた。しかし腎機能の修復機構に障害を有するモデル動物は知られておらず、修復機構の研究や修復を促進する薬剤の探索は試みられなかった。

【0056】本発明のモデル動物によって、損傷を受けた腎組織の修復機構や、修復を促進する機能を有する薬剤の研究が可能となる。腎組織の修復機構が障害されたモデル動物により、実際に患者の腎組織で修復が進まない機構を解明していくことができる。また本発明のモデル動物によって、修復機能を増強する薬剤の探索も可能となる。腎組織の障害によって作成された公知のモデル動物を用いる限り、このような機能を有する薬剤の探索は行えない。

【0057】本発明のモデル動物によって、腎組織損傷の修復機能不全の病態解明が可能となる。急性糸球体腎炎を除く多くの腎疾患においては、糸球体における修復機能に障害があると考えられており、これらの疾患の病態の解明や治療方法の探索において、本発明のモデル動物が果たす役割は大きい。本発明のモデル動物によって、これらの腎疾患の、腎組織損傷の修復機能の増強をもたらす薬剤をスクリーニングすることができる。

【0058】

【配列表】

# SEQUENCE LISTING

<110> MIYATA, Toshio

Japan Science and Technology Corporation.

<120> A renal dysfunction model animals

&lt;130&gt; KRK-A0201

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 15

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1143

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1140)

&lt;400&gt; 1

```

atg gcc tcc ctt gct gca gca aat gca gag ttt tgc ttc aac ctg ttc 48
Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Cys Phe Asn Leu Phe
      1              5              10              15
aga gag atg gat gac aat caa gga aat gga aat gtg ttc ttt tcc tct 96
Arg Glu Met Asp Asp Asn Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser
              20              25              30
ctg agc ctc ttc gct gcc ctg gcc ctg gtc cgc ttg ggc gct caa gat 144
Leu Ser Leu Phe Ala Ala Leu Ala Leu Val Arg Leu Gly Ala Gln Asp
              35              40              45
gac tcc ctc tct cag att gat aag ttg ctt cat gtt aac act gcc tca 192
Asp Ser Leu Ser Gln Ile Asp Lys Leu Leu His Val Asn Thr Ala Ser
              50              55              60
gga tat gga aac tct tct aat agt cag tca ggg ctc cag tct caa ctg 240
Gly Tyr Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Ser Gly Leu Gln Ser Gln Leu
              65              70              75              80
aaa aga gtt ttt tct gat ata aat gca tcc cac aag gat tat gat ctc 288
Lys Arg Val Phe Ser Asp Ile Asn Ala Ser His Lys Asp Tyr Asp Leu
              85              90              95
agc att gtg aat ggg ctt ttt gct gaa aaa gtg tat ggc ttt cat aag 336
Ser Ile Val Asn Gly Leu Phe Ala Glu Lys Val Tyr Gly Phe His Lys
              100              105              110
gac tac att gag tgt gcc gaa aaa tta tac gat gcc aaa gtg gag cga 384
Asp Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Lys Leu Tyr Asp Ala Lys Val Glu Arg
              115              120              125
gtt gac ttt acg aat cat tta gaa gac act aga cgt aat att aat aag 432
Val Asp Phe Thr Asn His Leu Glu Asp Thr Arg Arg Asn Ile Asn Lys
              130              135              140
tgg gtt gaa aat gaa aca cat ggc aaa atc aag aac gtg att ggt gaa 480
Trp Val Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Asn Val Ile Gly Glu
              145              150              155              160
ggc ggc ata agc tca tct gct gta atg gtg ctg gtg aat gct gtg tac 528
Gly Gly Ile Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr
              165              170              175
ttc aaa ggc aag tgg caa tca gcc ttc acc aag agc gaa acc ata aat 576
Phe Lys Gly Lys Trp Gln Ser Ala Phe Thr Lys Ser Glu Thr Ile Asn
              180              185              190
tgc cat ttc aaa tct ccc aag tgc tct ggg aag gca gtc gcc atg atg 624

```

Cys His Phe Lys Ser Pro Lys Cys Ser Gly Lys Ala Val Ala Met Met  
 195 200 205  
 cat cag gaa cgg aag ttc aat ttg tct gtt att gag gac cca tca atg 672  
 His Gln Glu Arg Lys Phe Asn Leu Ser Val Ile Glu Asp Pro Ser Met  
 210 215 220  
 aag att ctt gag ctc aga tac aat ggt ggc ata aac atg tac gtt ctg 720  
 Lys Ile Leu Glu Leu Arg Tyr Asn Gly Gly Ile Asn Met Tyr Val Leu  
 225 230 235 240  
 ctg cct gag aat gac ctc tct gaa att gaa aac aaa ctg acc ttt cag 768  
 Leu Pro Glu Asn Asp Leu Ser Glu Ile Glu Asn Lys Leu Thr Phe Gln  
 245 250 255  
 aat cta atg gaa tgg acc aat cca agg cga atg acc tct aag tat gtt 816  
 Asn Leu Met Glu Trp Thr Asn Pro Arg Arg Met Thr Ser Lys Tyr Val  
 260 265 270  
 gag gta ttt ttt cct cag ttc aag ata gag aag aat tat gaa atg aaa 864  
 Glu Val Phe Phe Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asn Tyr Glu Met Lys  
 275 280 285  
 caa tat ttg aga gcc cta ggg ctg aaa gat atc ttt gat gaa tcc aaa 912  
 Gln Tyr Leu Arg Ala Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe Asp Glu Ser Lys  
 290 295 300  
 gca gat ctc tct ggg att gct tcg ggg ggt cgt ctg tat ata tca agg 960  
 Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Ile Ser Arg  
 305 310 315 320  
  
 atg atg cac aaa tct tac ata gag gtc act gag gag ggc acc gag gct 1008  
 Met Met His Lys Ser Tyr Ile Glu Val Thr Glu Glu Gly Thr Glu Ala  
 325 330 335  
 act gct gcc aca gga agt aat att gta gaa aag caa ctc cct cag tcc 1056  
 Thr Ala Ala Thr Gly Ser Asn Ile Val Glu Lys Gln Leu Pro Gln Ser  
 340 345 350  
 acg ctg ttt aga gct gac cac cca ttc cta ttt gtt atc agg aag gat 1104  
 Thr Leu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg Lys Asp  
 355 360 365  
 gac atc atc tta ttc agt ggc aaa gtt tct tgc cct tga 1143  
 Asp Ile Ile Leu Phe Ser Gly Lys Val Ser Cys Pro  
 370 375 380  
 <210> 2  
 <211> 380  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2  
 Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Cys Phe Asn Leu Phe  
 1 5 10 15  
 Arg Glu Met Asp Asp Asn Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser  
 20 25 30  
 Leu Ser Leu Phe Ala Ala Leu Ala Leu Val Arg Leu Gly Ala Gln Asp  
 35 40 45  
 Asp Ser Leu Ser Gln Ile Asp Lys Leu Leu His Val Asn Thr Ala Ser  
 50 55 60  
 Gly Tyr Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Ser Gly Leu Gln Ser Gln Leu

65		70		75		80									
Lys	Arg	Val	Phe	Ser	Asp	Ile	Asn	Ala	Ser	His	Lys	Asp	Tyr	Asp	Leu
			85						90					95	
Ser	Ile	Val	Asn	Gly	Leu	Phe	Ala	Glu	Lys	Val	Tyr	Gly	Phe	His	Lys
			100					105					110		
Asp	Tyr	Ile	Glu	Cys	Ala	Glu	Lys	Leu	Tyr	Asp	Ala	Lys	Val	Glu	Arg
		115					120					125			
Val	Asp	Phe	Thr	Asn	His	Leu	Glu	Asp	Thr	Arg	Arg	Asn	Ile	Asn	Lys
	130					135					140				
Trp	Val	Glu	Asn	Glu	Thr	His	Gly	Lys	Ile	Lys	Asn	Val	Ile	Gly	Glu
145				150					155					160	
Gly	Gly	Ile	Ser	Ser	Ser	Ala	Val	Met	Val	Leu	Val	Asn	Ala	Val	Tyr
			165					170					175		
Phe	Lys	Gly	Lys	Trp	Gln	Ser	Ala	Phe	Thr	Lys	Ser	Glu	Thr	Ile	Asn
		180						185					190		
Cys	His	Phe	Lys	Ser	Pro	Lys	Cys	Ser	Gly	Lys	Ala	Val	Ala	Met	Met
		195					200					205			
His	Gln	Glu	Arg	Lys	Phe	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Glu	Asp	Pro	Ser	Met
	210					215					220				
Lys	Ile	Leu	Glu	Leu	Arg	Tyr	Asn	Gly	Gly	Ile	Asn	Met	Tyr	Val	Leu
225				230					235					240	
Leu	Pro	Glu	Asn	Asp	Leu	Ser	Glu	Ile	Glu	Asn	Lys	Leu	Thr	Phe	Gln
			245					250					255		
Asn	Leu	Met	Glu	Trp	Thr	Asn	Pro	Arg	Arg	Met	Thr	Ser	Lys	Tyr	Val
		260						265					270		
Glu	Val	Phe	Phe	Pro	Gln	Phe	Lys	Ile	Glu	Lys	Asn	Tyr	Glu	Met	Lys
		275					280					285			
Gln	Tyr	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Leu	Lys	Asp	Ile	Phe	Asp	Glu	Ser	Lys
	290					295				300					
Ala	Asp	Leu	Ser	Gly	Ile	Ala	Ser	Gly	Gly	Arg	Leu	Tyr	Ile	Ser	Arg
305				310					315					320	
Met	Met	His	Lys	Ser	Tyr	Ile	Glu	Val	Thr	Glu	Glu	Gly	Thr	Glu	Ala
			325						330				335		
Thr	Ala	Ala	Thr	Gly	Ser	Asn	Ile	Val	Glu	Lys	Gln	Leu	Pro	Gln	Ser
		340					345						350		
Thr	Leu	Phe	Arg	Ala	Asp	His	Pro	Phe	Leu	Phe	Val	Ile	Arg	Lys	Asp
	355						360					365			
Asp	Ile	Ile	Leu	Phe	Ser	Gly	Lys	Val	Ser	Cys	Pro				
	370					375				380					

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1229

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (8)..(1147)

&lt;400&gt; 3

tttcaaa atg gcc tcc ctt gct gca gca aat gca gaa ttt ggc ttc gac 49

Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Gly Phe Asp

1

5

10

tta ttc aga gag atg gat agt agt caa gga aac gga aat gta ttc ttc	97
Leu Phe Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe	
15 20 25 30	
tct tcc ctg agc atc ttc act gcc ctg agc cta atc cgt ttg ggt gct	145
Ser Ser Leu Ser Ile Phe Thr Ala Leu Ser Leu Ile Arg Leu Gly Ala	
35 40 45	
cga ggt gac tgt nnn cgt cag att gac aag gcc ctg cac ttt atc tcc	193
Arg Gly Asp Cys Xaa Arg Gln Ile Asp Lys Ala Leu His Phe Ile Ser	
50 55 60	
cca tca aga caa ggg aat tca tcg aac agt cag cta gga ctg caa tat	241
Pro Ser Arg Gln Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Leu Gly Leu Gln Tyr	
65 70 75	
caa ttg aaa aga gtt ctt gct gac ata aac tca tct cat aag gat nnn	289
Gln Leu Lys Arg Val Leu Ala Asp Ile Asn Ser Ser His Lys Asp Xaa	
80 85 90	
aaa ctc agc att gcc aat gga gtt ttt gca gag aaa gta ttt gat ttt	337
Lys Leu Ser Ile Ala Asn Gly Val Phe Ala Glu Lys Val Phe Asp Phe	
95 100 105 110	
cat aag agc tat atg gag tgt gct gaa aac tta tac aat gct aaa gtg	385
His Lys Ser Tyr Met Glu Cys Ala Glu Asn Leu Tyr Asn Ala Lys Val	
115 120 125	
gaa aga gtt gat ttt aca aat gat ata caa gaa acc aga ttt aaa att	433
Glu Arg Val Asp Phe Thr Asn Asp Ile Gln Glu Thr Arg Phe Lys Ile	
130 135 140	
aat aaa tgg att gaa aat gaa aca cat ggc aaa atc aag aag gtg ttg	481
Asn Lys Trp Ile Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Lys Val Leu	
145 150 155	
ggg gac agc agc ctc agc tca tca gct gtc atg gtg cta gtg aat gct	529
Gly Asp Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala	
160 165 170	
gtt tac ttc aaa ggc aag tgg aaa tcg gcc ttc acc aag agt gat acc	577
Val Tyr Phe Lys Gly Lys Trp Lys Ser Ala Phe Thr Lys Ser Asp Thr	
175 180 185 190	
ctc agt tgc cat ttc agg tct ccc agc ggt cct gga aaa gca gtt aat	625
Leu Ser Cys His Phe Arg Ser Pro Ser Gly Pro Gly Lys Ala Val Asn	
195 200 205	
atg atg cat caa gaa cgg agg ttc aat ttg tct acc att cag gag cca	673
Met Met His Gln Glu Arg Arg Phe Asn Leu Ser Thr Ile Gln Glu Pro	
210 215 220	
cca atg cag att ctt gag cta caa tat cat ggt ggc ata agc atg tac	721
Pro Met Gln Ile Leu Glu Leu Gln Tyr His Gly Gly Ile Ser Met Tyr	
225 230 235	
atc atg ttg ccc gag gat gac cta tcc gaa att gaa agc aag ctg agt	769
Ile Met Leu Pro Glu Asp Asp Leu Ser Glu Ile Glu Ser Lys Leu Ser	
240 245 250	
ttc cag aat cta atg gac tgg aca aat agc agg aag atg aaa tct cag	817
Phe Gln Asn Leu Met Asp Trp Thr Asn Ser Arg Lys Met Lys Ser Gln	
255 260 265 270	
tat gtg aat gtg ttt ctc ccc cag ttc aag ata gag aaa gat tat gaa	865

```

Tyr Val Asn Val Phe Leu Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asp Tyr Glu
      275              280              285
atg agg agc cac ttg aaa tct gta ggc ttg gaa gac atc ttt gtt gag   913
Met Arg Ser His Leu Lys Ser Val Gly Leu Glu Asp Ile Phe Val Glu
      290              295              300
tcc agg gct gat ctg tct gga att gcc tct gga ggt cgt ctc tat gta   961
Ser Arg Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Val
      305              310              315
tca aag cta atg cac aag tcc ctc ata gag gtc tca gaa gaa ggc acc   1009
Ser Lys Leu Met His Lys Ser Leu Ile Glu Val Ser Glu Glu Gly Thr
      320              325              330
gag gca act gct gcc aca gaa agt aac atc gtt gaa aag cta ctt cct   1057
Glu Ala Thr Ala Ala Thr Glu Ser Asn Ile Val Glu Lys Leu Leu Pro
      335              340              345              350
gaa tcc acg gtg ttc aga gct gac cgc ccc ttt ctg ttt gtc att agg   1105
Glu Ser Thr Val Phe Arg Ala Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg
      355              360              365

aag aat ggc atc atc tta ttt act ggc aaa gtc tcg tgt cct           1147
Lys Asn Gly Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro
      370              375              380
tgaaattcta tttggttttc catacactaa caggcatgaa gaaacatcat aagtgaatag 1207
aattgtaatt ggaagtacat gg                                         1229
<210> 4
<211> 380
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus
<400> 4
Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Gly Phe Asp Leu Phe
  1              5              10              15
Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser
      20              25              30
Leu Ser Ile Phe Thr Ala Leu Ser Leu Ile Arg Leu Gly Ala Arg Gly
      35              40              45
Asp Cys Xaa Arg Gln Ile Asp Lys Ala Leu His Phe Ile Ser Pro Ser
      50              55              60
Arg Gln Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Leu Gly Leu Gln Tyr Gln Leu
      65              70              75              80
Lys Arg Val Leu Ala Asp Ile Asn Ser Ser His Lys Asp Xaa Lys Leu
      85              90              95
Ser Ile Ala Asn Gly Val Phe Ala Glu Lys Val Phe Asp Phe His Lys
      100              105              110
Ser Tyr Met Glu Cys Ala Glu Asn Leu Tyr Asn Ala Lys Val Glu Arg
      115              120              125
Val Asp Phe Thr Asn Asp Ile Gln Glu Thr Arg Phe Lys Ile Asn Lys
      130              135              140
Trp Ile Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Lys Val Leu Gly Asp
      145              150              155              160
Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr
      165              170              175

```



Phe Lys Gly Lys Trp Lys Ser Ala Phe Thr Lys Ser Asp Thr Leu Ser  
                   180                  185                  190  
 Cys His Phe Arg Ser Pro Ser Gly Pro Gly Lys Ala Val Asn Met Met  
                   195                  200                  205  
 His Gln Glu Arg Arg Phe Asn Leu Ser Thr Ile Gln Glu Pro Pro Met  
                   210                  215                  220  
 Gln Ile Leu Glu Leu Gln Tyr His Gly Gly Ile Ser Met Tyr Ile Met  
 225                  230                  235                  240  
 Leu Pro Glu Asp Asp Leu Ser Glu Ile Glu Ser Lys Leu Ser Phe Gln  
                   245                  250                  255  
 Asn Leu Met Asp Trp Thr Asn Ser Arg Lys Met Lys Ser Gln Tyr Val  
                   260                  265                  270  
 Asn Val Phe Leu Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asp Tyr Glu Met Arg  
                   275                  280                  285  
 Ser His Leu Lys Ser Val Gly Leu Glu Asp Ile Phe Val Glu Ser Arg  
                   290                  295                  300  
 Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Val Ser Lys  
 305                  310                  315                  320  
 Leu Met His Lys Ser Leu Ile Glu Val Ser Glu Glu Gly Thr Glu Ala  
                   325                  330                  335  
 Thr Ala Ala Thr Glu Ser Asn Ile Val Glu Lys Leu Leu Pro Glu Ser  
                   340                  345                  350  
 Thr Val Phe Arg Ala Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg Lys Asn  
                   355                  360                  365  
 Gly Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro  
                   370                  375                  380

<210> 5  
 <211> 1386  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1143)  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1354)..(1354)  
 <223> n represents an unspecified base.  
 <400> 5

atg gcc tcc ctt gct gca gca aat gca gaa ttt ggc ttc gac tta ttc 48  
 Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Gly Phe Asp Leu Phe  
 1                  5                  10                  15  
 aga gag atg gat agt agc caa gga aat gga aat gta ttc ttc tct tcc 96  
 Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser  
                   20                  25                  30  
 ctg agc atc ttc act gcc ctg acc cta atc cgt ctg ggt gct cga ggt 144  
 Leu Ser Ile Phe Thr Ala Leu Thr Leu Ile Arg Leu Gly Ala Arg Gly  
                   35                  40                  45  
 gac tgt gca cgt cag att gac aag gca ctg cac ttt aac ata cca tca 192  
 Asp Cys Ala Arg Gln Ile Asp Lys Ala Leu His Phe Asn Ile Pro Ser  
                   50                  55                  60

aga caa gga aac tca tct aat aat cag cca gga ctt cag tat caa ttg	240
Arg Gln Gly Asn Ser Ser Asn Asn Gln Pro Gly Leu Gln Tyr Gln Leu	
65 70 75 80	
aaa aga gtt ctt gct gac ata aac tca tct cat aag gat tat gaa ctc	288
Lys Arg Val Leu Ala Asp Ile Asn Ser Ser His Lys Asp Tyr Glu Leu	
85 90 95	
agc att gcc act gga gtt ttt gca gaa aaa gtc tat gac ttt cat aag	336
Ser Ile Ala Thr Gly Val Phe Ala Glu Lys Val Tyr Asp Phe His Lys	
100 105 110	
aac tac att gag tgt gct gaa aac tta tac aat gct aaa gtg gaa aga	384
Asn Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Asn Leu Tyr Asn Ala Lys Val Glu Arg	
115 120 125	
gtt gac ttc aca aat gat gta caa gat acc aga ttt aaa att aat aaa	432
Val Asp Phe Thr Asn Asp Val Gln Asp Thr Arg Phe Lys Ile Asn Lys	
130 135 140	
tgg att gaa aat gag aca cat gga aag atc aag aag gtg ttg ggc gac	480
Trp Ile Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Lys Val Leu Gly Asp	
145 150 155 160	
agc agc ctc agc tcg tcg gct gtc atg gtg ctg gtg aac gct gtt tac	528
Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr	
165 170 175	
ttc aaa ggc aaa tgg aaa tcg gcc ttc acc aag act gat acc ctc agt	576
Phe Lys Gly Lys Trp Lys Ser Ala Phe Thr Lys Thr Asp Thr Leu Ser	
180 185 190	
tgc cgt ttt agg tct ccc acg tgt cct gga aaa gta gtt aat atg atg	624
Cys Arg Phe Arg Ser Pro Thr Cys Pro Gly Lys Val Val Asn Met Met	
195 200 205	
cat caa gaa cgg cgg ttc aat ttg tct acc att cag cag cca cca atg	672
His Gln Glu Arg Arg Phe Asn Leu Ser Thr Ile Gln Gln Pro Pro Met	
210 215 220	
cag gtt ctt gag ctc caa tat cat ggt ggc ata agc atg tac att atg	720
Gln Val Leu Glu Leu Gln Tyr His Gly Gly Ile Ser Met Tyr Ile Met	
225 230 235 240	
ctg cct gag gat ggc cta tgt gaa att gaa agc aag ctg agt ttc cag	768
Leu Pro Glu Asp Gly Leu Cys Glu Ile Glu Ser Lys Leu Ser Phe Gln	
245 250 255	
aat ctg atg gac tgg acc aat agg agg aaa atg aaa tct cag tat gtg	816
Asn Leu Met Asp Trp Thr Asn Arg Arg Lys Met Lys Ser Gln Tyr Val	
260 265 270	
aac gtg ttt ctc ccc cag ttc aag ata gag aag aat tat gaa atg acg	864
Asn Val Phe Leu Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asn Tyr Glu Met Thr	
275 280 285	
cac cac ttg aaa tcc tta ggc ttg aaa gat atc ttt gat gag tcc agt	912
His His Leu Lys Ser Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe Asp Glu Ser Ser	
290 295 300	
gca gat ctc tct gga att gcc tct gga ggt cgt ctc tac gta tca aag	960
Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Val Ser Lys	
305 310 315 320	

```

cta atg cac aag tca ttc ata gag gtc tca gag gag ggc act gaa gcc      1008
Leu Met His Lys Ser Phe Ile Glu Val Ser Glu Glu Gly Thr Glu Ala
              325                      330                      335
act gct gcc aca gaa aat aac att gtt gaa aag cag ctt cct gag tcc      1056
Thr Ala Ala Thr Glu Asn Asn Ile Val Glu Lys Gln Leu Pro Glu Ser
              340                      345                      350
aca gtg ttc aga gcc gac cgc ccc ttt ctg ttt gtc atc aag aag aat      1104
Thr Val Phe Arg Ala Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val Ile Lys Lys Asn
              355                      360                      365
gac atc atc tta ttt act ggc aaa gtc tct tgt cct tga aattcgattt      1153
Asp Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro
              370                      375                      380
ggtttcctat acagtaacag gcatcaagaa gcatcataag tgaatagaat tgtaattgga      1213
aatacatggg ttgtcttga ttgttttcag tgcattgatg gtcagcaaat gatactgggtg      1273
acttaactct tticgatacc tggttgatag tctaaatgcc tgctctcadc atttctactc      1333
catttacttc cctttgtcta ntactattga cccatctggg gtttgatcca etc      1386
<210> 6
<211> 380
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> misc_feature
<222> (1354)..(1354)
<223> n represents an unspecified base.
<400> 6
Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Gly Phe Asp Leu Phe
1              5              10              15
Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser
              20              25              30
Leu Ser Ile Phe Thr Ala Leu Thr Leu Ile Arg Leu Gly Ala Arg Gly
              35              40              45
Asp Cys Ala Arg Gln Ile Asp Lys Ala Leu His Phe Asn Ile Pro Ser
              50              55              60
Arg Gln Gly Asn Ser Ser Asn Asn Gln Pro Gly Leu Gln Tyr Gln Leu
65              70              75              80
Lys Arg Val Leu Ala Asp Ile Asn Ser Ser His Lys Asp Tyr Glu Leu
              85              90              95
Ser Ile Ala Thr Gly Val Phe Ala Glu Lys Val Tyr Asp Phe His Lys
              100             105             110
Asn Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Asn Leu Tyr Asn Ala Lys Val Glu Arg
              115             120             125
Val Asp Phe Thr Asn Asp Val Gln Asp Thr Arg Phe Lys Ile Asn Lys
              130             135             140
Trp Ile Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Lys Val Leu Gly Asp
145             150             155             160
Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr
              165             170             175
Phe Lys Gly Lys Trp Lys Ser Ala Phe Thr Lys Thr Asp Thr Leu Ser
              180             185             190
Cys Arg Phe Arg Ser Pro Thr Cys Pro Gly Lys Val Val Asn Met Met

```

195	200	205
His Gln Glu Arg Arg Phe	Asn Leu Ser Thr Ile Gln Gln Pro Pro Met	
210	215	220
Gln Val Leu Glu Leu Gln Tyr His Gly Gly Ile Ser Met Tyr Ile Met		
225	230	235
Leu Pro Glu Asp Gly Leu Cys Glu Ile Glu Ser Lys Leu Ser Phe Gln		
245	250	255
Asn Leu Met Asp Trp Thr Asn Arg Arg Lys Met Lys Ser Gln Tyr Val		
260	265	270
Asn Val Phe Leu Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asn Tyr Glu Met Thr		
275	280	285
His His Leu Lys Ser Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe Asp Glu Ser Ser		
290	295	300
Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Val Ser Lys		
305	310	315
Leu Met His Lys Ser Phe Ile Glu Val Ser Glu Glu Gly Thr Glu Ala		
325	330	335
Thr Ala Ala Thr Glu Asn Asn Ile Val Glu Lys Gln Leu Pro Glu Ser		
340	345	350
Thr Val Phe Arg Ala Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val Ile Lys Lys Asn		
355	360	365
Asp Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro		
370	375	380

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 7

gtcgacattg attattgact ag

22

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 8

ccataaggtc atgtactg

18

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 9

cttctggcgt gtagccggcg 20

<210> 10

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 10

atcgaattct gagatcataa tccctgtggg atgc 34

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 11

ttattcagtg gcaaagtttc ttgcccttga 30

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 12

tcgagggatc ttcataagag aagag 25

## 【図面の簡単な説明】

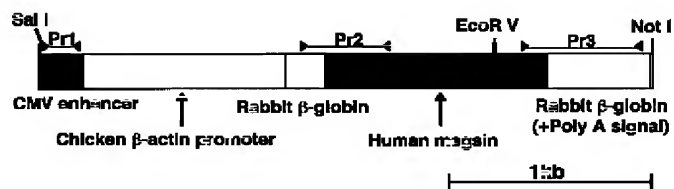
【図1】ヒトメグシン遺伝子の導入用コンストラクトの構造を示す図。

【図2】抗GBM腎炎を誘導した野生型マウス（上）とメグシントランスジェニックマウス（下）の、処理後7日目（左）と28日目（右）における糸球体の顕微鏡写

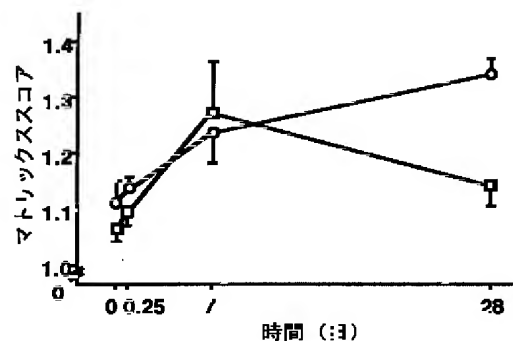
真。（PAS染色、200倍）

【図3】抗GBM腎炎マウスにおけるメサンギウム基質の拡大半定量的解析の結果を示すグラフ。図中、縦軸はスコア、横軸は抗GBM抗血清処理後の日数を、そして□は野生型マウスの、○はトランスジェニックマウスの結果を示す。

【図1】

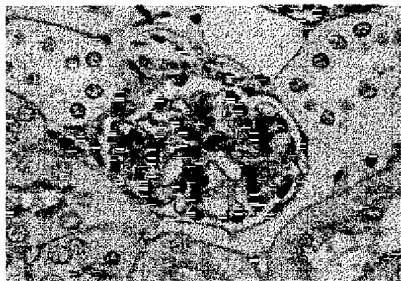


【図3】

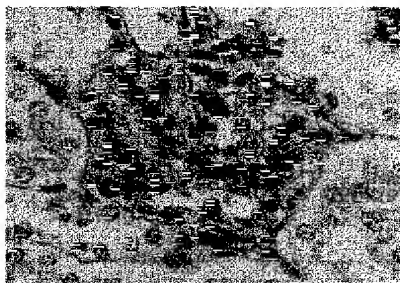
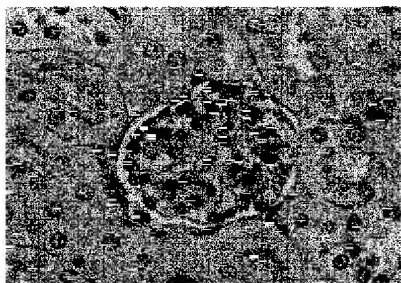
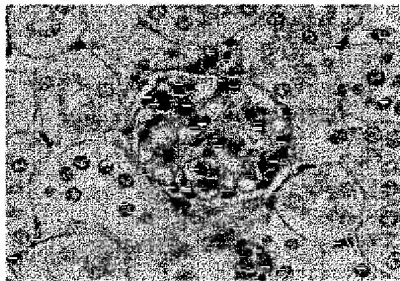


【図2】

7日目



28日目



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	(参考)
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/50	Z
33/50		33/566	
33/566		C 1 2 N 15/00	A
Fターム(参考)	2G045 AA29 AA40 FB03		
	4B024 AA01 AA10 CA02 CA04 DA02		
	GA11		
	4C084 AA17 NA14 ZA811 ZB211		
	ZC412		